

[19]中华人民共和国专利局

[11]授权公告号



[12] 发明专利说明书

CN 1021228C

[21] 专利号 ZL 88108944

[51]Int.Cl⁵

C07H 17/00

[45]授权公告日 1993年6月16日

[24]颁证日 93.4.9

[21]申请号 88108944.3

[22]申请日 88.12.23

[30]优先权

[32]87.12.28 [33]US [31]138,735

[73]专利权人 伊莱利利公司

地 址 美国印第安纳州

[72]发明人 哈罗德·雷蒙·卡特

哈罗德·伯纳德·海斯

C12P 1/00 C09K 9/00

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 改进的万古霉素沉淀法

[57]摘要

本发明提供一种大规模生产万古霉素的改进方法。该方法包括万古霉素碱从 pH 值至少约 7.8 的水溶液中静止沉淀。

权 利 要 求 书

1. 一种沉淀万古霉素碱的方法，该方法包括在沉淀开始前，在约10℃至30℃下将约含75mg/ml至200mg/ml万古霉素的万古霉素水溶液与碱水溶液快速混合，得到pH值约为7.8至9.0的溶液，并且使之在无搅拌下延续沉淀。
2. 根据权利要求1所述方法，其中pH值约为8.0至8.5。
3. 根据权利要求1所述方法，其中pH值约为8.2。
4. 根据权利要求1所述方法，其中开始沉淀前使pH达到约为8.0至8.5，并停止搅拌。
5. 根据权利要求4所述方法，其中pH值约为8.2。
6. 根据权利要求1-5任一项所述方法，其中所述水溶液约含85mg/ml至160mg/ml万古霉素。
7. 根据权利要求6所述方法，其中在温度约为20℃至25℃进行该反应。
8. 根据权利要求7所述方法，其中碱是氢氧化钠。

改进的万古霉素沉淀法

本发明提供一种大规模生产万古霉素的改进方法。该方法包括从pH值至少约7.8的水溶液中静止沉淀万古霉素碱。

万古霉素是一个在商业上获得成功的抗生素，自二十世纪五十年代后期至今一直在市场上销售。万古霉素及其制备和离析法公布于美国专利3,067,099号。美国专利3,816,618号还介绍了万古霉素用来提高反刍类的进食效率。

由于万古霉素的意義及其重要性，人们一直在探索从这种抗生素发酵混合物中离析万古霉素的新而更有效方法。

万古霉素是一种发酵产物。常规是过滤发酵肉汤，将滤液酸化并通过一个或多个色谱树脂柱，使产生抗生素活性分离，然后通过搅拌加碱，将含净抗生素活性洗脱液的pH值调节至约8.0至8.2。一般在约pH7.2至7.5之间，即达到所要求pH值之前，就开始沉淀万古霉素碱。搅拌该晶体浆料，将pH值连续调节至所需程度，直至完全沉淀。这种方法的收率不稳定、沉淀难以预测，不规则形成沉淀物并难以过滤。就工业规模而言，仅用压滤机处理适当时间就可完成过滤，但用平底漏斗或离心机不能分离得到沉淀物。

二十多年来，万古霉素碱浆料过滤困难一直是工业规模生产万古霉素的一个问题。早先试图获得分离产品都未成功。

业已发现，如果将万古霉素碱的沉淀，延缓至溶液的pH值至少为约7.8时进行，并在无搅拌下完成沉淀，则可连续产生晶形良好的大片状结晶。这些片晶易于用平底漏斗、离心机或压滤机过滤。此外，片晶收

率提高，其过滤性的改进使溶液含待处理万古霉素的浓度较高，因而还增加了每批万古霉素的收率和提高了处理效率。

本发明的改进方法包括在沉淀开始前将万古霉素水溶液与碱水溶液快速混合，使溶液pH至少约为7.8,并且在无搅拌下连续沉淀。术语“至少约pH7.8”意指最小pH值，在该值时，静止沉淀技术能产生良好成形、易于过滤的万古霉素碱片晶。当万古霉素浓度高时，如不搅拌，在pH低达约7.5时有可能形成这种沉淀物。但是，在这些条件下，沉淀不完全而且收率降低。如果沉淀开始后，连续搅拌很长时，会得到不规则的难于过滤的产品。pH值在约9.0以上时，将影响万古霉素的稳定性，降低产量并且得到变色的产品。当pH值约为7.8至9.0,优选为约8.0至8.5之间，最好为约8.2时开始沉淀，能得到最佳结果。较理想的是，pH值在约8.0至8.5之间，并在沉淀开始前停止搅拌。

在本发明的一个实施例中，用碱把万古霉素洗脱浓缩物的pH值调至约pH6.5至7.0,所述碱即在水溶液中能产生氢氧根离子的化合物，例如氢氧化钠、氢氧化钾等。取出1份试样，用滴定测定将pH值提高到至少约7.8所需的碱量，把计算量的碱搅拌下快速加到洗脱浓缩物中，使之在沉淀开始前pH值至少达约7.8。最理想是在压力下将碱加到洗脱浓缩物中，加碱后立即停止搅拌，并静置该溶液。最好以这样的速度加碱，即能在开始沉淀前pH值达到约8.0至8.5,最好达到约8.2,并停止搅拌。由此得到易于过滤的良好成形的大片晶。

在本发明的另一实施例中，将洗脱浓缩物的pH值调节到约6.5至7.0,将该溶液在搅拌下快速加到适当浓度的碱溶液中，使最终的pH值至少约7.8,所述碱溶液可以经缓冲的。加入洗脱浓缩物后立即停止搅拌。另外最好在开始沉淀前将全容量洗脱液加入碱，并且最终pH值在约为8.0至8.5之间，以约8.2为最佳，从而得到易于过滤的良好成形的大片晶。

沉淀速度受该溶液温度影响，最好使溶液温度维持在约10℃至30℃之间，当溶液温度约高于30℃，往往在pH值至少达到约7.8之前就开始沉淀，得到的万古霉素碱难于过滤。反之，当温度低于约10℃时，沉淀过程缓慢，两小时后才完成不足半数。因此，为了能在工业合理的时间内得到易于过滤的沉淀物，应在温度约10℃至30℃，最好为约20℃至25℃之间进行结晶。

沉淀速度还受洗脱液中万古霉素浓度影响，该洗脱浓缩物含万古霉素约75mg/ml至200mg/ml为好，以约85mg/ml至160mg/ml为最佳。一般来说浓度越高，沉淀速度也越快，而且沉淀也越完全。当浓度较高时，有必要在约20℃或更低的温度下调节pH值，以避免万古霉素碱的过早沉淀。然后升温至约25℃，直至完全沉淀。当浓度低于约75mg/ml时，溶液中万古霉素碱的沉淀较缓慢，由此得到的产物过滤速度也比高浓度得到的产物慢。

以下实施例用以说明本发明，并不作为限制。

实施例1

通过搅拌加入3N氢氧化钠，将440ml含75mg/ml万古霉素的洗脱浓缩物等分试样调节至pH7.0，再在75秒内，加入3N氢氧化钠，把pH值调节到7.0至8.24，加入氢氧化钠后即停止搅拌，1.5分钟后，万古霉素碱开始沉淀，该溶液温度维持在25℃。通过紫外线测定结晶速度，约6小时后，用配置在玻璃柱中的直径1.25 Buchner板，在压力14psi下过滤该浆料，滤饼先后用105ml 50%甲醇水溶液和105ml 甲醇洗涤。过滤时间为7.5分钟，第一次洗涤时间为11.0分钟，第二次洗涤时间为9.0分钟。万古霉素碱的收率为90.0%。

实施例2-5

用含量90、120和160mg/ml的洗脱浓缩物重复实施例1的方法。在160mg/ml溶液中沉淀进行两次，在第一次实验期间，温度控制在25℃，

pH为7.9 时开始沉淀，当加入全等分试样氢氧化钠，并pH值为8.24时，停止搅拌。在第二次实验中，洗脱液为10℃，氢氧化钠溶液为15℃，此时给出的结晶温度为21℃，待加入氢氧化钠，pH值达8.23后立即停止搅拌，35-40秒钟后开始沉淀。

实施例1 至5 的结果概述于表1 。

实施例6-9

用浓度为83.7mg/ml 的洗脱液重复实施例1 的方法，但改变温度条件。其结果概述于表2 。在实施例9 中，温度为30℃，在加入全部氢氧化钠前就开始沉淀。

表1

结晶的万古霉素%

	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5
	万古霉素浓度 mg/ml				
时间	75	90	120	160*	160(冷却)
30分钟		62.0	87.4	95.9	
45分钟	63.6				92.9
60分钟	82.5	82.5	92.4	96.2	92.8
90分钟	84.1	85.8			94.6
105 分钟			94.5		
120 分钟	84.8	88.1	94.9		
150 分钟	86.0	90.3	95.6		
180 分钟	88.5				95.4
210 分钟	88.7	92.4			
300 分钟	90.0				

* pH7.9 时开始沉淀

过滤时间

过滤, 分钟	7.5	3.7	1.2	3.1	0.9
第一次洗涤,分钟	11.0	5.9	2.3	7.6	1.6
第二次洗涤,分钟	9.0	5.9	2.8	8.3	1.3
总计	27.5	15.5	6.3	19.0	3.8

表2

结晶的万古霉素%

	实施例6	实施例7	实施例8	实施例9
	温		度	
时间	5 °C	20°C	25°C	30°C
30分钟	12.7	11.2	51.1	94.4
60分钟	26.1	22.2	73.3	94.3
90分钟	35.7	37.5	83.9	95.3
120 分钟	35.9	42.4	85.6	
150 分钟	38.2	49.3	86.7	
180 分钟		57.1	86.8	
270 分钟		73.5		
360 分钟		78.3		

实施例10

将尿素(14.8g) 加到200ml 含74mg/ml 万古霉素的洗脱浓缩物等分试样中, 用33ml 3N 氢氧化钠将pH值调节至6.5,在10-15 秒内, 搅拌下将该溶液加入30ml含2.5g 乙酸钠的3N氢氧化钠中, 随之立即停止搅拌, 该溶液pH为8.0, 温度保持在25°C, 立刻开始沉淀万古霉素碱。30分钟后, 用直径9cm 的Buchner 过滤该浆料, 滤饼先后用100ml 50% 甲醇水溶液和100ml 甲醇洗涤。过滤时间为1.9 分钟, 第一次洗涤时间为2.6 分钟, 第二次洗涤时间为2.6 分钟。收率为95.0%。

实施例11-14

用不同量的尿素和乙酸钠重复实施例10的方法。在某些情况下，第二次洗涤用甲醇，并增加用丙酮作第三次洗涤。

作为对照，用现有技术方法从含73mg/ml 万古霉素的洗脱液制得200ml 晶体浆料，置于9cm Buchner 进行过滤。

实施例10-14 的结果概述于表3。

表3

过滤时间

	实施例10	实施例11	实施例12	实施例13	实施例14 对照
尿素, g	14.8	14.8	无	无	
乙酸钠, g	2.5	2.0	2.0	无	
洗涤序1	50%MeOH	MeOH	50%MeOH	50%MeOH	50%MeOH
2	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
3			丙酮		丙酮
过滤, 分钟	1.9	1.6	1.5	0.75	10.7
第一次洗涤, 分钟	2.6	1.6	1.25	0.67	21.8
第二次洗涤, 分钟	2.6	1.5	0.35	0.43	11.0
第三次洗涤, 分钟			0.25		2.0
总计	7.1	4.7	3.35	1.85	45.5
收率%	95.2	91.4	89.2	91.7	~85

实施例15

19°C下，在750l含85mg/ml 万古霉素的温度为15°C的洗脱浓缩物中加入氢氧化钠，将pH值调节至7.0。滴定1 等分试样使之pH达8.2, 计算该洗脱液pH值增至8.2 时所需3N氢氧化钠的用量，得到所需量为56l, 在2.5 分钟内将其加入压力罐，并吸入槽中，此后停止搅拌，在加入全部氢氧化钠前沉淀开始，该溶液温度稳定在25°C。4.5 小时后，用压滤机

过滤该浆料，滤饼用水洗涤，直至导电率小于 300 μmho (约13001)，接着用9501丙酮进行第二次洗涤。过滤时间为10分钟，第一次洗涤时间为15分钟，第二次洗涤时间为7分钟，收率为92%。

实施例16-17

重复实施例15的方法，不同的是在1.5分钟内加入氢氧化钠，待加完后15秒钟开始沉淀。

实施例15和16的结果与含 $75 \pm 15 \text{mg/ml}$ 万古霉素的洗脱液，采用现有技术方法的上述三种标准生产过程的平均过滤时间作对照。

实施例15-17的结果概述于表4。

表4

	过滤时间		
	实施例15	实施例16	实施例17 对照(平均值)
过滤, 分钟	10	8	20
第一次洗涤, 分钟	15	13	80
第二次洗涤, 分钟	7	8	150
总计	32	29	250
收率%	92	92	~ 85